

平成15年度 大学院理学研究科修士論文論題と要旨

真正粘菌変形体⇄スクレロチウムの変換における リン酸化ミオシン脱リン酸化酵素

岡 田 千 沙 (指導教員 金子堯子)

【背景と目的】真正粘菌 (*Physarum polycephalum*) 変形体は、乾燥、低温、飢餓などの生育に不利な条件のもとで、変形体で認められる活発な原形質流動を停止し、細胞壁を持つ耐性型細胞のスクレロチウム (Sc) に分化する。Sc は水分処理により変形体に再分化する。本研究の最終目的は、この分化の過程の仕組みを明らかにすることにある。私達の研究室ではこれまでに、変形体から Sc 形成を高頻度で誘導する実験系を開発してきた (市川 2002)。それによって Sc 形成に伴う原形質流動停止は、Sc 形成と一致することが観察された。原形質流動の停止は、リン酸化ミオシン (PMLC) の脱リン酸化 (DP) によって引き起こされると言われている。真正粘菌において、PMLC-DP 酵素が同定されたという報告はない。そこで上記のことを手掛かりとして、この酵素を明らかにすることにした。

これまでに、変形体から Sc 形成と原形質流動停止の各開始時期にほぼ一致して *p*-NPP-DP 活性 (pH5.0) のピークを示す、細胞内脱リン酸化酵素が報告されている。この酵素は pH5.0 で *p*-NPP-DP 活性を、pH7.6 で PMLC-DP 活性を持つ (鈴木 1998, 岡田 2002)。本酵素には 2 つのアイソフォーム、E1 と E2 が存在し、それぞれの変形体から Sc 形成過程の *p*-NPP-DP 活性の変動パターンにおいて、E1 では活性の減少傾向のみ認められたが、E2 の活性のピークは Sc 形成および原形質流動停止の開始に先行して認められた (市川, 岡田 2002)。これらの結果より、E2 由来の PMLC-DP 活性により原形質流動の停止が引き起こされ、続いて Sc が形成される可能性が示唆された。

そこで本研究では、①PMLC-DP 活性により原形質流動の停止が引き起こされ、Sc が形成される。および、②E2 は Sc 形成過程と Sc の変形体再形成過程のどちらに関わるか。の 2 点を検討して E2 の機能を明らかにし、さらに③E2 の酵素的諸特性を調べ、脱リン酸化反応を触媒するプロテインホスファターゼとしての位置づけをする。④E2 の PMLC-DP 酵素活性を担う構成タンパク質成分を明らかにする。⑤E2 のアミノ酸配列を明らかにし、ホモロジー検索を行う。の 3 点を明らかにすることで、E2 を新規の PMLC-DP 酵素として同定することを目的とする。

【材料と方法】変形体 (Ng-1 株) を実験材料とした。1. 変形体→Sc 誘導：変形体を寒天培地で、暗所飢餓処理条件下で培養した。Sc→変形体誘導：Sc を寒天培地で、水分処理条件下で培養した。どちらの場合もそれぞれ 0.5 日毎に回収し、粗酵素抽出、native-PAGE により E2 を抽出した。2. 変形体を栄養寒天培地で培養し、酵素抽出の試料とした。2-1：粗酵素抽出、40-75% 硫酸分画、DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィー (DEAE 標品)、DEAE を担体とした HPLC (HPLC 標品)、native-PAGE により、E2 を精製した。2-2：粗酵素抽出、40-75% 硫酸分画、DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィー (DEAE 標品)、butyl-toyopearl カラムクロマトグラフィー (butyl 標品)、native-PAGE により E2 を精製した。

【結果と考察】変形体の Sc 形成過程において、Sc 形成と原形質流動停止の各開始時期に先行して、E2 の PMLC-DP 活性のピークが認められた。一方、Sc から変形体を 2.0 日間に渡り再誘導した結果、誘導開始 1.0 日目で変形体形成率 100% が得られ、原形質流動開始と変形体形成の挙動が一致した。しかし、変形体誘導 2.0 日間を通して、E2 の *p*-NPP-DP 活性は全く検出されなかった (滝沢 2002)。これらの結果より、E2 は変形体から Sc 形成過程に PMLC-DP 活性を通して、特異的に作用することが初めて示唆された。

HPLC において、*p*-NPP-DP 活性 (pH5.0) および PMLC-DP 活性 (pH7.6) の溶出プロファイルは完全に一致した。HPLC 標品は E1 と E2 から構成され、E2 の精製倍率は約 70 倍であった。さらに酵素的諸特性により E2 は脱リン酸化反応を触媒するプロテインホスファターゼ (PP) の PP1 に分類されるということが明らかにされた。

HPLC から native-PAGE により得た E2 標品は、SDS-PAGE 上で major なタンパク質成分 50kDa から構成されていた。この成分が活性を担うかを調べるために、カラムクロマトグラフィーにおける溶出分画毎に、酵素活性とタンパク質量のプロファイルを求めた。HPLC では 1 度に分析可能なタンパク質量 (2 mg) が限られているため、上記プロファイルの検出が困難と予想された。そこで、DEAE 標品 (40 mg) を 1 度に分析できる butyl-toyopearl カラムクロマトグラフィーを新たに導入した (方法 2-2)。その結果、E2 の酵素活性および 50kDa タンパク質のプロファイルは完全に一致した。従って、E2 の酵素活性を担うタンパク質は 50kDa であることが証明された。

【今後の予定】現在、E2 標品の 50kDa タンパク質成分の N 末端アミノ酸シーケンスを行っている最中である。